

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-267669

(43)Date of publication of application : 18.09.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 21/03
G01N 21/27
G01N 33/543
G01N 33/566

(21)Application number : 2001-072278

(71)Applicant : TECHNO NETWORK SHIKOKU CO LTD

(22)Date of filing : 14.03.2001

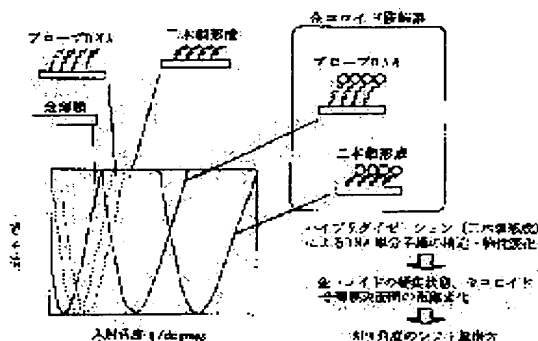
(72)Inventor : MISAWA HIROAKI
YAMAGUCHI HIROSHI

(54) METHOD OF ANALYZING GENE, AND MICROARRAY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of analyzing gene which can detect a nucleotide having a specific base sequence simply and with satisfactory accuracy by measuring a surface plasmon resonance.

SOLUTION: The nucleotide which is labeled in advance with a noble metal colloid is immobilized to a noble-metal thin-film substrate, it is hybridized with a nucleotide as a specimen, a change in the surface plasmon resonance is intensified, and the measurement accuracy of gene can be enhanced.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-267669
(P2002-267669A)

(43) 公開日 平成14年9月18日 (2002.9.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		C 0 1 N 33/53	M 2 G 0 5 7
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 5 9
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 21/03	Z 4 B 0 2 9
G 0 1 N 21/03		21/27	C 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-72278(P2001-72278)

(22) 出願日 平成13年3月14日 (2001.3.14)

(71) 出願人 501103000

株式会社テクノネットワーク四国
香川県高松市丸の内2番5号

(72) 発明者 三澤 弘明

徳島県徳島市大谷町大開40-39

(72) 発明者 山口 央

徳島県徳島市住吉4丁目10-60 第一三宅
ビル405

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

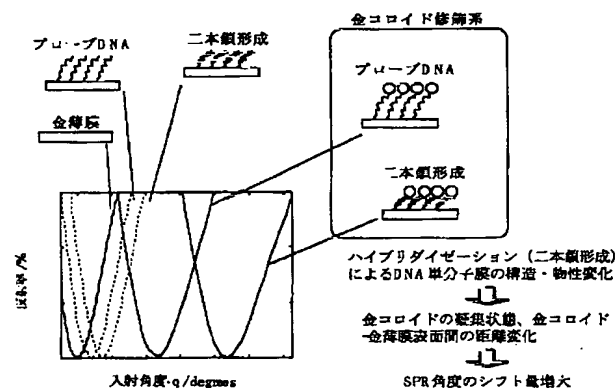
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子解析方法とマイクロアレイ

(57) 【要約】

【課題】 特定塩基配列をもつヌクレオチドに対し表面プラズモン共鳴を測定することで簡便に精度よく検出できる遺伝子解析方法を提供するものである。

【解決手段】 貴金属薄膜基板に予め貴金属コロイドを標識したヌクレオチドを固定化し、検体のヌクレオチドとハイブリダイズし、表面プラズモン共鳴変化を増強させることで、簡便に測定精度を向上させる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板に固定した特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドと検体の一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを表面プラズモン共鳴の変化により測定することを特徴とする遺伝子解析方法。

【請求項2】 請求項1の方法において、特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドを予め貴金属コロイドで標識することを特徴とする遺伝子解析方法。

【請求項3】 請求項1または2の方法において、基板を貴金属基板もしくは貴金属薄膜基板とすることを特徴とする遺伝子解析方法。

【請求項4】 気相中もしくは液相中においてハイブリダイゼーションさせることを特徴とする請求項1ないし3のいずれかの遺伝子解析方法。

【請求項5】 遺伝子解析のためのマイクロアレイであって、基板上に特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドが固定されており、検体の一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを表面のプラズモン共鳴の変化により測定することを特徴とする遺伝子解析マイクロアレイ。

【請求項6】 請求項5のマイクロアレイであって、基板上に固定されている特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドは、予め貴金属コロイドで標識されていることを特徴とする遺伝子解析マイクロアレイ。

【請求項7】 請求項5または6のマイクロアレイであって、基板は、貴金属基板もしくは貴金属薄膜基板であることを特徴とする遺伝子解析マイクロアレイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、遺伝子の特定塩基配列の検出方法とこれに用いるマイクロアレイに関するものであり、特にハイブリダイゼーションにより塩基配列を特定したい遺伝子群に特別な標識を施すことなく簡便に高感度に検出することのできる、新しい遺伝子解析方法とそのための遺伝子解析マイクロアレイに関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来の遺伝子検出方法、特に特定の塩基配列をハイブリダイゼーションにより検出する方法としては、当初、放射性同位体元素を、さらには蛍光色素をヌクレオチドの標識剤とする方法がとられていた。

【0003】初期に利用されていた放射性同位体元素を利用した標識方法は高感度ではあるが、被爆汚染や廃棄処理等の問題があり、今日ではその利用も少なくなっており、その代替として、蛍光色素を利用した標識法が採用されている。

【0004】例えば、ビオチン標識したデオキシヌクレオチドをニックトランスレーション、ランダムプライマー法等の方法によりヌクレオチドにビオチン標識し、ハイブリダイズさせたときにアルカリフォスファターゼで

標識したアビジンとヌクレオチドのビオチンが結合し、アルカリフォスファターゼが発色することから、これにより特定塩基配列の遺伝子を検出するようにしている (Nucleic Acids Research 13巻 745頁 1985年)。

【0005】このような発色検出には、ビオチン標識のほかにフルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、アロフィコシアニン等の蛍光色素を直接ヌクレオチドに標識する方法もあり、放射性同位体元素に代わり高感度に遺伝子を検出可能としている。

【0006】また、ヌクレオチドニックトランスレーション法等で標識するのではなく、ヌクレオチドの5'-あるいは3'-末端に蛍光色素等を共有結合させる方法も提案されている(例えば、Anal. Biochem 183巻 231頁 1989年)。

【0007】以上の方法を応用して近年、チップ上に細かくヌクレオチドを配列させたDNAマイクロアレイが開発され、アフィメトリックス社のGene Chipに代表される高処理能力を有する遺伝子解析装置が市販されている。

【0008】しかしながら、上記の蛍光色素を利用する方法では、測定者がプローブとしようとするオリゴヌクレオチドを何らかの方法で標識しなくてはならない。これは、生体から抽出した微量の貴重な試料においても同様であり、測定者の専門性が要求される。また、ヌクレオチドの標識、ハイブリダイゼーション、未反応の標識ヌクレオチドの洗浄と一連の操作が極めて複雑であり、だれでも簡便に扱える仕様ではなかった。さらに検体試料自身に蛍光色素を標識しているため、未反応試料が洗浄不十分によるバックグラウンドノイズの原因になると及び蛍光の消光による測定誤差等の問題があった。

【0009】そこで、これらの色素標識による問題を解決するため、色素標識をしない貴金属微粒子を標識とした測定方法が提案されている。

【0010】一つは、貴金属基板上にポリマー粒子を担持し、そのポリマー粒子の上部を貴金属蒸着させ、その上にヌクレオチドを固定化し、ハイブリダイゼーションの検出を表面プラズモン共鳴により測定する方法である(例えば、特開平10-833939、特開2000-055920)。この方法は、貴金属基板に貴金属コロイド粒子を担持したときに表面プラズモン共鳴変化が増強する現象(例えば、Physical Review B 27巻 7765頁 1983年、Solid State Commun. 93巻 171頁 1995年、J. Phy. Chem. B 103巻 5826頁 1999年)を応用し、貴金属コロイドの代わりにポリマー粒子を担持した後、ポリマーを貴金属蒸着したものである。もう一つは、貴金属微粒子存在下でのハイブリダイゼーションによる二本鎖形成で生じる貴金属粒子との重合反応を分光学的変化により測定しようとする

るものである（例えば、特開平07-227299）。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、以上のとおりの改善された方法においても依然として解決すべき課題があった。

【0012】それと言うのも、まず、前者のハイブリダイゼーションの検出を表面プラズモン共鳴により測定する方法の場合には、貴金属基板上にポリマー微粒子を整列させ、さらに貴金属蒸着させなければならず、工法的に非常に手間がかかる。また表面プラズモン共鳴を測定するには担持したポリマー微粒子を加えた貴金属基板の厚さが高精度に均一でなくてはならないが、ポリマー微粒子の径を高精度に均一にすることは、極めて困難であるため測定精度に問題がある。

【0013】一方、後者の貴金属微粒子存在下、ヌクレオチドの二本鎖形成で生じる貴金属粒子との重合反応を分光学的変化により測定しようとする方法では貴金属微粒子の重合は一本鎖ヌクレオチドにおいても生じるため、超遠心分離、ゲルろ過あるいは高速液体クロマトグラフィー等の一本鎖ヌクレオチドの分離操作を施さなくてはならないので、簡便性に欠けるという問題がある。

【0014】この出願の発明は、以上のとおりの従来の技術の問題点を解消し、表面プラズモン共鳴の測定法の特徴を生かし、塩基配列を特定したい遺伝子群に特別な標識過程を施すことなく、簡便に、しかも高感度に検出することのできる、新しい遺伝子解析方法と、これに用いることのできる遺伝子解析マイクロアレイを提供することを課題としている。

【0015】

【課題を解決するための手段】この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、基板に固定した特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドと検体の一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを表面プラズモン共鳴の変化により測定することを特徴とする遺伝子解析方法を提供する。

【0016】そして、この出願の発明は、上記方法について、第2には、特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドを予め貴金属コロイドで標識することを特徴とする遺伝子解析方法を提供し、第3には、基板を貴金属基板もしくは貴金属薄膜基板とすることを特徴とする遺伝子解析方法を、第4には、気相中もしくは液相中においてハイブリダイゼーションさせることを特徴とする遺伝子解析方法を提供する。

【0017】また、この出願の発明は、第5には、遺伝子解析のためのマイクロアレイであって、基板上に特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドが固定されており、検体の一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを表面のプラズモン共鳴の変化により測定することを特徴とする遺伝子解析マイクロアレイを提供し、第6には、上記のマイクロアレイであって、基板上に固定され

ている特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドは、予め貴金属コロイドで標識されていることを特徴とする遺伝子解析マイクロアレイを、第7には、基板は、貴金属基板もしくは貴金属薄膜基板であることを特徴とする遺伝子解析マイクロアレイを提供する。

【0018】以上のとおりのこの出願の発明の遺伝子解析方法は、前処理過程が非常に複雑な色素標識検出法ではなく、ヌクレオチド、もしくは貴金属微粒子で標識したヌクレオチドを予め基板上に固定化しておき、生体から抽出したヌクレオチドに何も処理を施さずに特定塩基配列を表面プラズモン共鳴により検出することを特徴としたものである。

【0019】この出願の発明によれば、検体となる一本鎖ヌクレオチドの標識や過度な洗浄、あるいは、分離操作による未反応の一本鎖ヌクレオチドの除去等の従来法のような複雑な処理をすることがなく、操作は簡便であり、精度よく特定塩基配列をもつ遺伝子を解析することができる。

【0020】

【発明の実施の形態】この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

【0021】この出願の第1の発明における遺伝子解析方法は、特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドと検体の一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを表面プラズモン共鳴の変化により測定することを特徴とするものであり、特定塩基配列を持つ一本鎖のヌクレオチドとそれと相補的な一本鎖ヌクレオチドが2本鎖を形成することが表面プラズモン共鳴の共鳴角の変化に影響を及ぼすことで特定塩基配列の検出を実現しうるものである。

【0022】すなわち、たとえば図1に例示したように、表面プラズモン共鳴（SPR）の測定は、通常、入射角度 θ と反射光強度の変化として観測されるが、このような変化は、図2に例示したように、たとえば金属膜基板に固定した特定塩基配列を持つ一本鎖のヌクレオチド（プローブDNA）が、これと相補的な、検体の一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションで二本鎖を形成する際のDNA単分子膜の構造、物性の変化に伴って観察されることになる。

【0023】反射光強度が最小となるSPRの角度のシフトには、膜厚や表面密度の変化および吸着量の増大等が反映される。

【0024】このような変化、特にSPRの角度のシフトは、この出願の第2の発明のように、特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドが予め貴金属コロイドで標識してあることで、図3のように増強され、感度が向上されることになる。

【0025】たとえば図3のように、金コロイドの凝集状態や金コロイドー金薄膜表面間の距離変化も反映さ

れ、一定入射角度での反射強度の変化はより大きく増幅されることになる。これによって、表面プラズモン共鳴 (SPR) による検出精度の向上を実現することができる。

【0026】上記いずれの場合にも、検体の一本鎖ヌクレオチドは一切標識する必要がない。もちろん特別な目的のために標識されていてもよいが、この出願の発明においては必須ではない。

【0027】また、この出願の発明における基板に固定された一本鎖ヌクレオチドは、貴金属コロイド以外のものによって、SPR変化を増強するようにしてもよい。ただ、貴金属コロイドは、この増強効果が極めて顕著なものとしてこの出願の発明により推奨される。貴金属コロイドの代表的なものとしては金コロイドが例示されることになる。もちろん、これ以外の銀等の貴金属のコロイドであってもよい。

【0028】このような、貴金属コロイド (粒子) は、通常は、その粒径として5~200nm程度の範囲のものが考慮されている。なかでも、10~50nmの粒径が好適である。

【0029】また、プローブDNAとしての、特定の塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドが固定される基板については、SPRの変化を的確に観測できるものであれば、金や銀等の貴金属、アルミニウム等の各種のものであってよいが、なかでも、この出願の第3の発明のように、貴金属の基板、もしくは貴金属の薄膜基板であることが望ましい。特に、貴金属としては金が例示される。

【0030】特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドと検体の一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによる二本鎖の形成にともなう二重らせん構造をとるヌクレオチドの構造変化は、予め標識してある貴金属コロイドと貴金属基板もしくは貴金属薄膜基板との相互作用を誘起することになる。この相互作用が表面プラズモン共鳴の変化に反映し、未反応の一本鎖ヌクレオチドの検体とハイブリダイズした二本鎖ヌクレオチドの検出の向上が実現されることになる。

【0031】以上のような基板、特に貴金属基板や貴金属薄膜基板については、その表面が平滑であることが望ましい。表面平滑な基板とすることで、特定塩基配列を持つ貴金属コロイドで標識した一本鎖ヌクレオチドを基板表面上に容易に整列させることができ、ヌクレオチドの二本鎖形成による二重らせん構造変化による表面プラズモン共鳴の変化の再現性の向上を図ることができる。

【0032】そして、この出願の発明は、以上のとおりの遺伝子解析法を実現するためのマイクロアレイをも提供する。このマイクロアレイは、前記のとおり特定の塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドであって、貴金属コロイド等で標識化したもの、もしくは標識化していないものを上記のとおり基板に固定したものであることを特徴としている。

【0033】このようなマイクロアレイについては、これまで公知の方法をはじめとして各種の手段を採用することで形成することができる。

【0034】たとえば、貴金属としての金の薄膜基板に特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチドを固定する場合について例示的に説明すると、まず、透明性の支持基板としての石英やガラス、あるいは樹脂等の表面に、気相蒸着、たとえばスパッタリング、イオンプレーティング、CVD等の手段によって金薄膜を形成することができる。この場合、支持基板と金薄膜との密着性を向上させるために、たとえばガラスや石英の表面の場合にはCr (クロム) 薄膜層を下地層として介在させておくことや、シラン化合物によって表面修飾しておくこと等が適宜に考慮されてよい。

【0035】金薄膜への一本鎖ヌクレオチドの固定は、ヌクレオチドを構成する官能基としてのチオール基との結合によって形成することができる。

【0036】たとえば以上のようにして、各種の基板へのDNAプローブとしての一本鎖ヌクレオチドの固定が可能とされる。また、金コロイド等による貴金属コロイド標識も公知の方法等により行うことができる。

【0037】作成された遺伝子解析マイクロアレイについては、検体となる一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションさせるが、このハイブリダイゼーションは、検体の一本鎖ヌクレオチドの緩衝液等との溶液をマイクロアレイ上に滴下することにより実施することができる。

【0038】ハイブリダイゼーションにともなう表面プラズモン共鳴 (SPR) の変化が測定されるが、この際には、たとえば図4の構成の測定装置が使用される。

【0039】たとえば金属膜基板のマイクロアレイの場合には、光源として波長632.8nmのHe-Neレーザーを用い、光チョッパーに透過させ、次に偏光子、λ/2板に透過させることで、レーザー光をp-偏光とし、三角プリズムや半円筒プリズム等のプリズムを介して、支持基板の裏側から照射する。なおプリズムと支持基板は、両者と同等の屈折率を有する屈折率整合剤により密着させる。反射光は光電子倍增管、ロックインアンプを用いて検出する。光源の入射角はプリズムを移動させることにより変化させる。

【0040】もちろん、上記のHe-Neレーザーに限定されることはない。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定では、白色光を用いることもできる。この白色光による測定では、単色光の光強度に代わって、色の変化を観察することが可能となる。

【0041】そこで以下に実施例を示し、さらに詳しくこの出願の発明について説明する。もちろん以下の例によって発明が限定されることはない。

【0042】

【実施例】1) 特定塩基配列を持つ一本鎖ヌクレオチド

一本鎖ヌクレオチドは、特開昭59-148798あるいはChollet A. らの方法 (Nucleic Acids Res. 13巻 1529頁1985年) に従い、5' 末端側からCAGACGTTGTTGTAAACGACGACGGCCAGATCATの塩基配列を持ち (Aはアデニン、Tはシトシン、Gはグアニン、Cはチミンをそれぞれ示す)、5' 末端の水酸基にリン酸基を付加し、1-アミノ-5-ヒドロキシヘキシルの6位の炭素と結合させることで5' 末端にビオチンを結合し、さらに3' 末端には末端のリン酸基に3-メルカプトプロピルの3位の炭素と結合させたものを化学合成した。

【0043】2) 金薄膜基板

まず、よく洗浄した合成石英基板を10%アミノプロピルトリエトキシシランに30分浸漬した後、スパッタ装置により金薄膜を蒸着し、300度に加熱して、表面を平滑にした膜厚50nmの金薄膜基板を得た。この金属膜の厚さは、SPR測定に有効な (共鳴角で反射率が0になる) 厚みとして、入射光の波長に依存する。一般的には、10~100nm程度の厚さとして考慮することができる。

【0044】3) 特定塩基配列の一本鎖ヌクレオチドの固定と金コロイド標識

以上のようにして作成した金薄膜基板を濃硫酸に浸漬して洗浄した後、前記のとおり合成した一本鎖ヌクレオチドを滴下し、一晩放置後貴金属とチオール基とが自発的に結合する性質を利用し、金薄膜に一本鎖ヌクレオチドを固定化した。

【0045】次に10ミリモル (以下、mMと略す) 塩化ナトリウム、5mMトリスヒドロキシメチルアミノメタン (以下、Trisと略す) -塩酸、(ピーエッチ (以下、pHと略す) 7.4) の溶液に懸濁させたストレプトアビジンで標識した直径10ナノメートルの金コロイド (シグマ社製) を滴下し、2時間放置することで、ストレプトアビジンとビオチンの親和性を利用して金基板に固定化した一本鎖ヌクレオチドを金コロイド標識した。

【0046】4) ハイブリダイゼーション

上記の通りに作成した金薄膜基板に固定した金コロイド標識の一本鎖ヌクレオチドと、検体となる一本鎖ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションは、1M塩化ナトリウム、1mMEDTA、10mMTris-塩酸 (pH 7.4) の溶液溶解した検体の一本鎖ヌクレオチドを滴下し、一晩放置することで行った。放置後、10mM塩化ナトリウム、5mMTris-塩酸 (pH 7.4) にて検体を洗浄除去した後、基板表面に窒素ガスを軽く吹き付け乾燥させたのち、図2の表面プラズモン共鳴測定装置の三角プリズム上に設置した。

【0047】5) 表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定
表面プラズモン共鳴 (SPR) は、前記の図4の装置を

用いて行った。そして、この実施例では、三角プリズムと支持基板の石英板との密着には、屈折率整合剤としてのグリセリンを用いている。

【0048】図5は、この装置による表面プラズモン共鳴測定の結果である。検体として金基板に固定化したヌクレオチドとパーフェクトマッチする5' 末端からATGTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGの塩基配列をもつ化学合成した一本鎖ヌクレオチドを用いた。実線は、ヌクレオチド未標識の金薄膜基板のみの表面プラズモン共鳴を測定したものである。三角プリズムを回転させ、光源の入射角度を変化させると次第に光源の反射率が低下し、46.0度の入射角度で反射率が極小値となり (これを共鳴角と称す)、さらに入射角度を変化させると再び反射率が回復していく。次に金薄膜基板に固定化した金コロイド標識一本鎖ヌクレオチドのみでの表面プラズモン共鳴を測定したのが、白丸 (A1) のプロットである。金基板単独の時と同様、入射角度を変化させると反射率が低下し、共鳴角が出現するが、その値は、46.57度に増加した。さらに検体の一本鎖ヌクレオチド滴下し、ハイブリダイゼーションを実施し、表面プラズモン共鳴を測定したのが、黒丸 (B1) のプロットである。入射角を変化させると反射率が低下するが、共鳴角は金基板に一本鎖ヌクレオチドを固定化した時よりもさらに角度が増加し、47.04度を示した。

【0049】図6は、図5に対する比較対称測定をした結果である。比較対称として金薄膜基板に固定化した一本鎖ヌクレオチドに金コロイド標識せずに図5と同様の測定をした。白四角 (A2) は、基板に一本鎖ヌクレオチドを固定化したのみでの、黒四角 (B2) はハイブリダイゼーション後の表面プラズモン共鳴を測定した結果である。一本鎖ヌクレオチドのみでの共鳴角は46.14度、ハイブリダイゼーション後の二本鎖ヌクレオチドの共鳴角は46.27度であった。これは、金薄膜基板単独での値、46.0度に対し、角度シフトが比較的非常に小さく、またハイブリダイゼーション前後の角度シフトも0.13度と金コロイド標識した時のハイブリダイゼーション前後の角度シフト0.47度に比べ約25%の変化であった。

【0050】以上のことから、ヌクレオチドへの金コロイド標識によりハイブリダイゼーションの結果が明瞭となり、検体の特定塩基配列を表面プラズモン共鳴により測定した時の信頼性を大幅に向上させることがわかる。これは中性子反射測定により本発明と同様に基板に固定化されたヌクレオチドのハイブリダイゼーション前後での基板表面の膜圧が1.4nmから7.5nmに変化した結果から (J. Am Chem. Soc. 120巻 9787頁 1998年)、ヌクレオチドのハイブリダイゼーションによるヌクレオチドの構造変化が、ヌクレオチドに標識してある金コロイドと金薄膜との距離の変

化に反映され表面プラズモン共鳴に影響すると推察される。

【0051】なお、図7は、空気中での測定と、水中での測定との結果を対比して示したものであるが、水中においても空気中と同様な応答が観察されている。このことから、この発明の方法が、気相中、液相中のいずれにおいても適用されることがわかる。

【0052】図7に見られる結果の差異は、空気中での金コロイド粒子と金薄膜表面との距離が、水中ではDNA鎖が伸びてより拡大していることによるものと推察される。

【0053】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明の遺伝子解析方法によれば、一本鎖ヌクレオチドを基板に固定化し、検体のヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによる表面プラズモン共鳴の変化を測定することで、使用者に複雑な前処理をすることなく簡便さらに精度よく特定塩基配列を持つヌクレオチドの検出ができる遺伝子解析方法を提供することが可能となる。さらに、検体のヌクレオチドには標識等の前処理を必要がないだけでなく、未反応のヌクレオチドを洗浄、除去するのきわめて容易であるため、使用者の負担を大幅

に軽減することが可能である。

【0054】特に、基板に固定した一本鎖ヌクレオチドを金等の貴金属のコロイドにより標識し、基板を金等の貴金属もしくはその薄膜とすることで、検出精度はより大きく向上し、検出信頼性を顕著に高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】表面プラズモン共鳴（SPR）の測定を示した概要図である。

【図2】ハイブリダイゼーションの前後の表面プラズモン共鳴（SPR）の変化について示した概要図である。

【図3】図2において、金コロイド修飾系の場合についても示した概要図である。

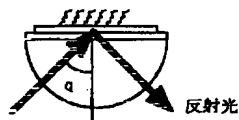
【図4】表面プラズモン共鳴測定装置の構成を例示した図である。

【図5】金コロイド標識したヌクレオチドの場合の表面プラズモン共鳴を測定した結果を例示した図である。

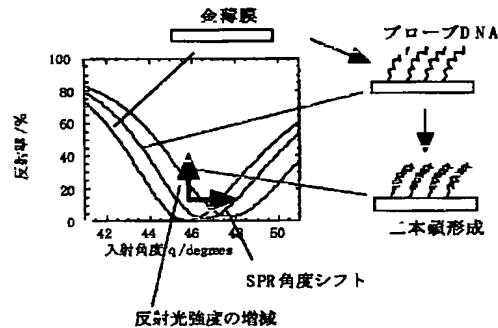
【図6】金コロイド標識していないヌクレオチドの場合の表面プラズモン共鳴を測定した結果を例示した図である。

【図7】空気中と水中での測定結果を対比して例示した図である。

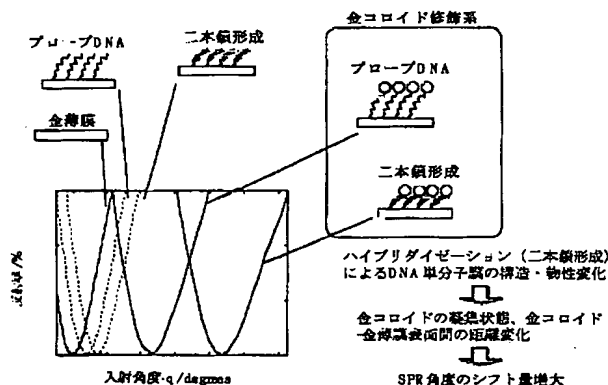
【図1】



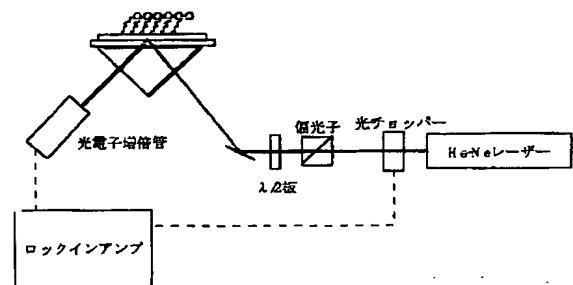
【図2】



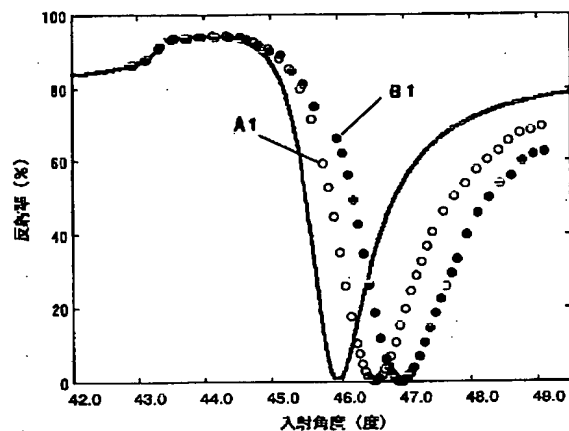
【図3】



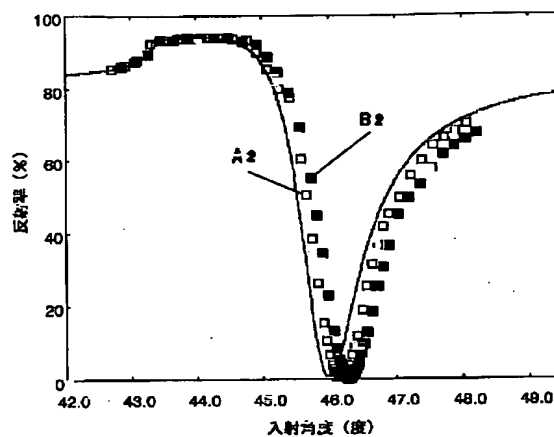
【図4】



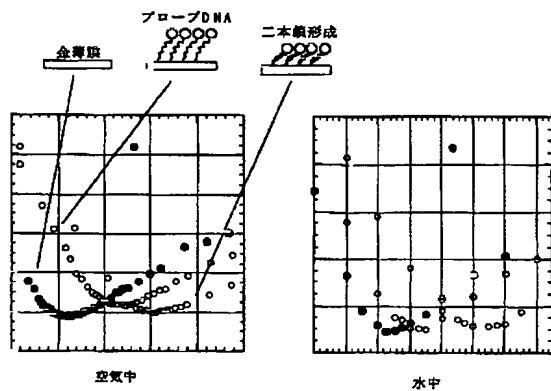
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G01N 21/27
33/543
33/566

識別記号

595

F I

G01N 33/543
33/566
C12N 15/00

(参考)

595

F

F ターム(参考) 2G057 AB01 AB04 AB07 AC01 BA01
BA03 BB01 BB02 BB06
2G059 AA05 BB12 CC16 EE02 EE05
FF07 GG01 GG04 HH02 HH06
JJ12 JJ19 JJ20 JJ24 KK02
NN01
4B024 AA11 AA19 CA04 CA09 CA11
HA12
4B029 AA23 BB20 CC03 CC08 FA12
4B063 QA01 QA13 QQ42 QQ52 QR32
QR55 QS32